MiSeqDx™ Universal Kit 1.0
Kurzanleitung

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Einführung	3
Erste Schritte	7
Protokoll-Workflow	19
MiSeqDx-Probenblattvorbereitung	20
Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools	26
Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden	30
Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden	35
PCR-Amplifikation	37
PCR-Reinigung	42
Bibliotheksnormalisierung	46
Bibliotheks-Pooling	51
Weitere Schritte	57
Technische Unterstützung	

ILLUMINA EIGENTUMSRECHTLICH GESCHÜTZT
Teile-Nr. 15036910 Rev. A DEU
Februar 2014

illumina®

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und verbundenen Unternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN, ODER JEDER ANDEREN ART DER VERWENDUNG DER PRODUKTE AUSSERHALB DES GÜLTIGKEITSBEREICHS DER AUSDRÜCKLICHEN SCHRIFTLICHEN LIZENZEN ODER DER DURCH ILLUMINA GENEHMIGTEN ZULASSUNGEN IN VERBINDUNG MIT DEM ERWERB DER PRODUKTE DURCH DEN KUNDEN.

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

© 2012-2014 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina und **MiSeqDx** sind Marken oder eingetragene Marken von Illumina, Inc. Alle anderen hierin enthaltenen Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

AMPure, Beckman und Beckman Coulter sind Marken oder eingetragene Marken der Beckman Coulter, Inc.

Einführung

Verwendungszweck

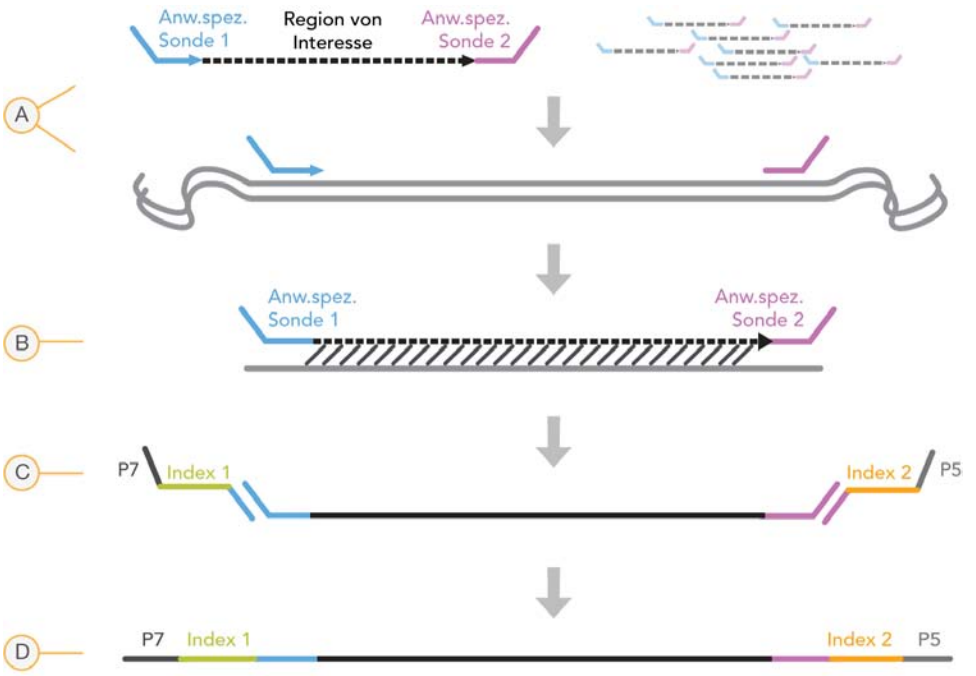
Das Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, der zum Verarbeiten von humangenomischen DNA-Proben aus peripheren Vollblutproben und in der anschließenden gezielten Sequenzierung der sich ergebenden Probenbibliotheken verwendet wird. Vom Benutzer bereitgestellte Analyt-spezifische Reagenzien werden für die Vorbereitung von Bibliotheken benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Das MiSeqDx Universal-Kit ist für das MiSeqDx-Gerät vorgesehen.

Über dieses Handbuch

Dieses Referenzhandbuch enthält detaillierte Anweisungen, Techniktipps und hilfreiche Hinweise für neu geschulte Benutzer, um sie bei der ordnungsgemäßen Durchführung des Protokolls für den MiSeqDx Universal-Kit zu unterstützen. Es ist als Ergänzung vorgesehen und nicht dazu gedacht, die Packungsbeilage zu ersetzen.

Wie funktioniert das Kit?

Ein Paar anwendungsspezifischer Oligonukleotide ist für jedes Amplikon konzipiert. Die Hybridisierung dieser Oligonukleotide in genomische DNA erfolgt in einer 96-Well-Platte, gefolgt von Extension und Ligation, um DNA-Matrizen zu bilden, die aus den Regionen von Interesse, flankiert von universellen Primer-Sequenzen, bestehen. Mithilfe von indizierten Primern, die im Lieferumfang des Kits enthalten sind, werden die DNA-Matrizen durch PCR amplifiziert, in einem einzelnen Röhrchen zusammengefasst und auf dem MiSeqDx-Gerät sequenziert.



A Hybridisierung von angepassten Oligonukleotid-Proben
B Extension und Ligation
C Hinzufügen von Indizes und Sequenzierungsadaptern durch PCR
D Letztes Amplikon bereit für die Sequenzierung mit MiSeqDx

Das Verfahren im Überblick

Die Schritte des Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 können wie folgt zusammengefasst werden:

Erstellen eines Probenblatts

Bereiten Sie zuerst ein Probenblatt vor, das vom MiSeqDx-Gerät verwendet wird, um die einzelnen Proben und ihre entsprechenden Indizes zu identifizieren. Um das Probenblatt vorzubereiten, verwenden Sie den Illumina Worklist Manager, eine assistentenbasierte Anwendung für das Aufzeichnen der Proben-ID, der Indizes und

anderer Parameter für die 96-Well-Platte.Das Probenblatt wird auch als Leitfaden für das Einrichten der Platte während des Kit-Protokolls verwendet.

Vorbereiten der Bibliotheken

Bereiten Sie die Bibliotheken anhand des Protokolls vor, das in diesem Benutzerhandbuch beschrieben ist.

Sequenzieren von Proben auf dem MiSeqDx-Gerät

Das MiSeqDx Universal-Kit muss unter Verwendung eines Paired-End-Laufs mit 150 Zyklen auf einem MiSeqDx-Sequenziersystem sequenziert werden. Anweisungen zum Durchführen eines Sequenzierungslaufs auf dem MiSeqDx-Gerät finden Sie im *MiSeqDx-Gerät – Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15038353_DEU).*

Automatisierte Sequenzierung und Datenanalyse

MiSeq Reporter verarbeitet die vom MiSeqDx-Sequenziersystem generierten Base-Calls. Es handelt sich dabei um Gerätesoftware, die in die Prozesse des Geräts integriert ist. Weitere Informationen über diese Software finden Sie im *MiSeq Software Reporter – Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15038356_DEU).*

Kontroll-Tools

Illumina bietet die folgenden Tools für das Kontrollieren von Proben und für Hilfe im Labor:

- Das **Laborkontrollformular** kann zum Aufzeichnen von Informationen verwendet werden, wie z. B. Bedienernamen, Informationen zur Probe und zum Index, Start- und Stoppzeiten, Reagenz-Chargennummern und Barcodes.
- Der **Illumina Worklist Manager** wird zum Erstellen des Probenblatts anhand einer assistentenbasierten Anwendung verwendet. Der Illumina Worklist Manager bietet eine Funktion für das Aufzeichnen von Parametern für die Probenplatte, z. B. der Proben-ID und der doppelten Indizes, sowie andere Funktionen für den Lauf.

HINWEIS

Sie können die oben angegebenen Dokumente zum Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 von der Illumina-Website unter http://support.illumina.com herunterladen. Gehen Sie zur Support-Seite für den Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 und klicken Sie auf die Registerkarte **Documentation & Literature**.

Dokumentation

Zusätzliche Dokumentation, z. B. das *MiSeqDx-Gerät – Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15038353_DEU)*, steht zum Download von der Illumina-Website bereit. Weitere Informationen finden Sie auf der Innenseite der Rückseite dieses Handbuchs.

Erste Schritte

In diesem Abschnitt werden der Inhalt von Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0, die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte, Empfehlungen zur DNA-Eingabe und die Best Practices, die während des Protokolls anzuwenden sind, beschrieben.

MiSeqDx Universal-Kit Inhalt

Das Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 enthält die in Tabelle 1 bis Tabelle 8 aufgelisteten Komponenten. Lagern Sie die Kit-Komponenten bei der angegebenen Temperatur und in ausgewiesenen Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereichen.

Da die Reagenzien für die Vor- und die Nachamplifikation zusammen versendet werden, ist es wichtig, die Reagenzien im Voramplifikationsbereich des Labors zu entpacken und anschließend die Reagenzien für die Nachamplifikation am richtigen Lagerort für die Nachamplifikation aufzubewahren.

MiSeqDx Universal-Kit, Karton 1

Tabelle 1 Karton 1A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Hybridisierungs-puffer	1 Röhrchen	4,32 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit einer proprietären Mischung aus DNA-Polymerasen, DNA-Ligasen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer A (A501) - H (A508)	1 Röhrchen pro Primer	192 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)	1 Röhrchen pro Primer	128 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
PCR-Polymerase	1 Röhrchen	56 µl	Proprietäre DNA-Polymerase	-25 °C bis -15 °C
PCR-Master-Mischung	1 Röhrchen	2,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 2 Karton 1B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Bibliotheksnormalisierungsverdünner	1 Röhrchen	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Bibliothek-Verdünnungspuffer	1 Röhrchen	4,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
Interne PhiX-Kontrolle	1 Röhrchen	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX-DNA	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Universal-Kit, Karton 2

Tabelle 3 Karton 2 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Inhalt	Lagerung
MiSeqDx-Reagenzienkartusche	2 Kartuschen	Einweg-Kartusche mit Clusterbildungs- und Sequenzierungsreagenzien für die Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät, einschließlich Formamid, 2-Mercaptoethanol und 2 % DMSO	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Universal-Kit, Karton 3

Tabelle 4 Karton 3A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Stringenter Wasch-Puffer	1 Flasche	24 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Universeller Wasch-Puffer	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C

Tabelle 5 Karton 3B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
PCR-Reinigungs-Beads	1 Röhrchen	5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads und Polyethylenglykol	2 °C bis 8 °C
Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer	2 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Bibliothek-Beads	1 Röhrchen	1,2 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
MiSeqDx-Fließzelle	2 Behälter	1 Fließzelle	Glassubstrat mit kovalent gebundenen Oligonukleotiden	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Universal-Kit, Karton 4

Tabelle 6 Karton 4 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
MiSeqDx SBS-Lösung (PR2)	2 Flaschen	353,1 ml	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Universal-Kit, Karton 5

Tabelle 7 Karton 5 Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Filterplatte	2 Platten	N/A	Polypropylen-Mikrotiterplatte mit einer modifizierten Polyethersulfonmembran	15 °C bis 30 °C

Tabelle 8 Karton 5 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Elutionspuffer	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Bibliothek-Lagerungspuffer	1 Röhrchen	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C

Geräte und Materialien

Bereitgestellte, separat erhältliche Geräte und Materialien

1 **MiSeqDx Gerät**, Katalognummer DX-410-1001

2 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs-Kit**, Katalognummer FC-130-1005

3 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs- und -Kranz-Kit**, Katalognummer FC-130-1007

4 **Ersatzverschlüsse für Indexadapter**, Katalognummer DX-502-1003

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Geräte und Materialien für die Voramplifikation

1 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für eine 96-Well-Platte benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen. Hitzeblöcke mit beheizten Deckeln sind zur Verwendung akzeptabel.
   - Temperaturbereich: Umgebung +5 °C bis 99 °C
   - Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C

2 **Probeninkubator** – Es wird ein Inkubator (Hybridisierungsofen) benötigt. Der Inkubator muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
   - Temperaturbereich: 10 °C bis 100 °C
   - Temperatursteuerung: ±0,2 °C

3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).

4 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.

5 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
- 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
  HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
- 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
- Lösungsbecken, PVC, DNasen-/RNasenfrei (Bottich)
- Klebende Aluminiumfolienversiegelung
- Entsprechende PCR-Plattenversiegelung
- Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Geräte und Materialien für die Nachamplifikation

1 **Thermocycler** – Es wird ein Thermocycler benötigt. Der Thermocycler muss einen beheizbaren Deckel besitzen und den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
- Temperatursteuerungsbereich: 4 °C bis 99 °C
- Steuerungsgenauigkeit: ±0,25 °C von 35 °C bis 99 °C

2 **Mikroplattenschüttler** – Es wird ein Mikroplattenschüttler im Nachamplifikationsbereich des Labors benötigt. Der Plattenschüttler muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
- Maximale Mischgeschwindigkeit: 3.000 rpm
- Mischgeschwindigkeitsbereich: 200 bis 3.000 rpm

3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Voramplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).

4 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für Röhrchen benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
- Temperaturbereich: Umgebung +5 bis 99 °C
- Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C

5 **Magnetstativ** – Es wird ein Magnetstativ für eine 96-Well-Platte benötigt. Die Leistung ist besser, wenn sich die Magnete an der Seite des Stativs und nicht am Boden befinden.

6 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Voramplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von

Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.

7 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.

- 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
  HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
- 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
- Konische 15-ml-Röhrchen
- Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen (Schraubverschluss empfohlen)
- PCR-8-fach-Röhrchenstreifen
- Lösungsbecken, PVC, DNasen-/RNasenfrei (Bottich)
- Klebende Aluminiumfolienversiegelung
- Klebende Plattenversiegelung
- Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Verhindern von PCR-Produktkontaminationen

Das PCR-Verfahren wird häufig im Labor verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Wenn im Laborbereich die Hygienevorschriften missachtet werden, können PCR-Produkte Reagenzien, Instrumente und genomische DNA-Proben verunreinigen, was zu ungenauen und unzuverlässigen Ergebnissen führt. Eine PCR-Produktkontamination kann Laborprozesse beenden und die normalen Betriebsabläufe erheblich verzögern.

Stellen Sie sicher, dass das Labor ordnungsgemäß eingerichtet ist, um das Risiko der PCR-Produktkontamination zu verringern:

- **Sorgen Sie für eine räumliche Trennung der Vor- und Nachamplifikationsbereiche**
  - Stellen Sie sicher, dass die Laborbereiche, in denen Voramplifikationsprozesse durchgeführt werden (DNA-Extraktion, -Quantifizierung und -Normalisierung), von den Laborbereichen, in denen Nachamplifikationsprozesse durchgeführt werden, räumlich voneinander getrennt sind.
  - Verwenden Sie zum Waschen von Vor- und Nachamplifikationsbottichen niemals dasselbe Waschbecken.

- Verwenden Sie für Vor- und Nachamplifikationsprozesse niemals dasselbe Wasserreinigungssystem.
- Lagern Sie alle Materialien, die in den Protokollen verwendet werden, im Voramplifikationsbereich und bringen Sie sie nach Bedarf in den Nachamplifikationsbereich.

- **Verwenden Sie die dafür vorgesehenen Gerätschaften und Materialien**
  - Weisen Sie vollständige Sätze von Gerätschaften und Materialien (Pipetten, Zentrifugen, Ofen, Hitzeblock usw.) den Vor- und Nachamplifikations-Laborprozessen zu und verwenden Sie sie niemals für beide Prozesse.
  - Bewahren Sie die Verbrauchsmaterialien für die Vor- und die Nachamplifikation in getrennten Lagerbereichen (Gefrier- und Kühlschränke) auf.

Da die Reagenzien für die Vor- und die Nachamplifikation zusammen versendet werden, ist es wichtig, die Reagenzien im Voramplifikationsbereich des Labors zu entpacken und anschließend die Reagenzien für die Nachamplifikation im entsprechenden Nachamplifikationslager aufzubewahren.

Laborverfahren der Vor- und Nachamplifikation

Zur Vermeidung einer PCR-Produktkontamination ist es wichtig, Laborverfahren festzulegen und die Best Practices einzuhalten. Illumina empfiehlt eine tägliche und wöchentliche Reinigung der Laborbereiche mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche).

ACHTUNG!
Um den Abbau von Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Dämpfe der Reinigungslösung vollständig verflüchtigt sind, bevor Sie mit anderen Verfahren beginnen.

Tägliche Reinigung des Voramplifikationsbereichs

Die tägliche Reinigung des Voramplifikationsbereichs mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) hilft, das PCR-Produkt zu beseitigen, das in den Voramplifikationsbereich gelangt ist.

Identifizieren Sie die Voramplifikationsbereiche, die das größte Risiko einer Kontaminierung darstellen, und reinigen Sie sie mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche), bevor Sie Voramplifikationsprozesse starten. Zu den Bereichen mit hohem Risiko könnten u. a. die folgenden gehören:

- Tischplatten

- Türgriffe
- Türgriffe von Kühlschränken und Gefrierfächern
- Computer-Maus
- Tastaturen

Tägliche Reinigung des Nachamplifikationsbereichs

Durch Verringern der Menge des PCR-Produkts im Nachamplifikationsbereich kann das Risiko einer Kontaminierung im Voramplifikationsbereich reduziert werden. Eine tägliche Reinigung der Nachamplifikationsbereich mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) kann dabei helfen.

Identifizieren Sie die Nachamplifikationsbereiche, die das größte Risiko einer Kontaminierung darstellen, und reinigen Sie sie täglich mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche). Zu den Bereichen mit hohem Risiko könnten u. a. die folgenden gehören:

- Thermocycler
- Arbeitsflächen, die für das Verarbeiten von amplifizierter DNA verwendet werden
- Türgriffe
- Türgriffe von Kühlschränken und Gefrierfächern
- Computer-Maus
- Tastaturen

Wöchentliche Reinigung aller Laborbereiche

Führen Sie einmal wöchentlich eine gründliche Reinigung der Vor- und Nachamplifikationsbereiche mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) durch.

- Reinigen Sie alle Tischplatten und Laboroberflächen.
- Reinigen Sie alle Instrumente, die nicht täglich gereinigt werden.
- Wischen Sie den Fußboden des Labors gründlich.
- Stellen Sie sicher, dass die Mitarbeiter, die für die wöchentliche Reinigung zuständig sind, entsprechend geschult sind, um eine PCR-Produktkontaminierung zu vermeiden.

Gegenstände, die auf den Boden fallen

Der Fußboden ist mit dem PCR-Produkt kontaminiert, das über die Schuhe von Personen, die aus dem Nachamplifikationsbereich kommen, übertragen wird. Daher ist alles, was auf den Boden fällt, als kontaminiert zu betrachten.

- Einwegartikel, die auf den Boden gefallen sind, wie z. B. leere Röhrchen, Pipettenspitzen, Handschuhe und Laborkittel-Kleiderbügel, müssen entsorgt werden.
- Wiederverwendbare Artikel, die auf den Boden gefallen sind, wie z. B. eine Pipette oder der Behälter einer wichtigen Probe, müssen sofort und gründlich mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) gereinigt werden, um PCR-Produktkontaminationen zu entfernen.
- Reinigen Sie alle Laboroberflächen, die in Kontakt mit dem kontaminierten Artikel gekommen sind. Personen, die mit irgend einem Artikel in Berührung kommen, das auf den Boden gefallen ist, sei es ein Ein- oder wiederverwendbarer Artikel, müssen ihre Laborhandschuhe entsorgen und ein neues Paar anziehen.

Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die folgenden Empfehlungen, wenn Sie mithilfe dieses Protokolls Bibliotheken für die Sequenzierung vorbereiten.

Sicherstellen der Einheitlichkeit

- **Mehrkanalpipetten verwenden** – Um Einheitlichkeit über alle Proben hinweg zu gewährleisten, verwenden Sie nach Möglichkeit eine Mehrkanalpipette. Kalibrieren Sie die Pipetten in regelmäßigen Abständen.
- **Einheitlichkeit bei kleineren Probenzubereitungen** – Jedes im Lieferumfang des Kits enthaltene Reagenzröhrchen enthält eine ausreichende Menge, um unter Verwendung von manuellen Pipetten und Reagenzbottichen Ergebnisse zu generieren, wenn die Standard-Labortechniken eingehalten werden. Um genaue Reagenzmengen zu gewährleisten, verwenden Sie eine Einzelpipette, um das Reagenz in jeden Well zu geben, oder pipettieren Sie mithilfe eines PCR-8-fach-Röhrchenstreifens.

Handhaben von magnetischen Beads

- **Bei Raumtemperatur verwenden** – Sorgen Sie vor dem Gebrauch dafür, dass die Beads Raumtemperatur haben.
- **Beads mit dem Vortexer mischen, bis sie gut suspendiert sind** – Mischen Sie die Beads unmittelbar vor Gebrauch mit dem Vortexer, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
- **Proben gründlich mischen** – Sobald Sie die Beads zu den Proben hinzugefügt haben, mischen Sie sie gründlich, indem Sie zehnmal auf- und abpipettieren. Illumina empfiehlt zudem die Verwendung eines Schüttlers, um die Proben gründlich zu mischen.
- **Maximale Bindung ermöglichen** – Um die besten Ergebnisse zu erzielen, inkubieren Sie die Bead/Proben-Mischungen bei Raumtemperatur für die gesamte im Protokoll angegebene Dauer.
- **Klare Lösung langsam aspirieren** – Platzieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ und warten Sie, bis die Lösung klar wird, bevor Sie fortfahren. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ und aspirieren Sie langsam die klare Lösung. Achten Sie dabei darauf, dass die separierten Beads nicht durcheinandergebracht werden.

Vermeiden einer Kreuzkontamination

- **Spitzen nach dem Zuführen von Reagenzien und Proben austauschen** – Verwenden Sie stets frische Pipettenspitzen beim Zuführen von Reagenzien und Proben.
- **Platten gemäß Anweisungen mischen** – Mischen Sie die Proben mit einer Mehrkanalpipette und zentrifugieren Sie die Platte zum angegebenen Zeitpunkt. Mischen Sie die Platten nicht mit dem Vortexer.
- **Aerosol-resistente Spitzen verwenden** – Die Verwendung von Aerosol-resistenten Pipettenspitzen verringert das Risiko einer Amplikon-Übertragung und einer Kreuzkontamination von Probe zu Probe.

Waschen mit 80% igem Ethanol während des PCR-Reinigungsschritts

- **Frisches 80% iges Ethanol zubereiten** – Bereiten Sie stets frisches 80% iges Ethanol für Waschläufe zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälscht.

- **Ethanol vollständig aus den Wells entfernen** – Stellen Sie sicher, dass das Ethanol vollständig aus den Wells entfernt wird, da es sonst Restverunreinigungen enthalten kann. Verwenden Sie eine P20-Mehrkanalpipette, um die Ethanolreste zu entfernen und das Trocknen zu beschleunigen.
- **Für vollständige Verdunstung sorgen** – Entfernen Sie beim Trocknen den Gegenstand vom Magnetstativ. Die vollständige Verdunstung dauert bei Raumtemperatur mindestens zehn Minuten. Ethanolreste können den Ablauf nachfolgender Reaktionen beeinträchtigen.

DNA-Eingabeanforderungen

- Das Protokoll des Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 erfordert 250 ng genomische DNA. Illumina empfiehlt dringend eine Quantifizierung des startenden genomischen Materials.
- **Quantifizierung der Eingabe-DNA** – Quantifizieren Sie das startende genomische Material mithilfe von UV-Spektralphotometermethoden basierend auf A260/A280-OD-Werten.
- **Beurteilung der DNA-Qualität** – In der Regel werden Absorptionsmessungen bei 260 nm durchgeführt, um DNA zu quantifizieren. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm wird als Indikator für die Reinheit der Probe verwendet. Dieses Protokoll ist für DNA mit einem Absorptionsverhältnis größer als 1,5 optimiert.

Qualitätskontrollen

- Die guten Laborpraktiken schreiben vor, dass jeder Lauf eine positive Kontroll-DNA-Probe und eine negative Kontrollprobe (No Template Control) enthalten muss.
- Die positive Kontroll-DNA-Probe muss eine gut charakterisierte Probe mit bekannten Varianten in der Region von Interesse sein.

Akronyme

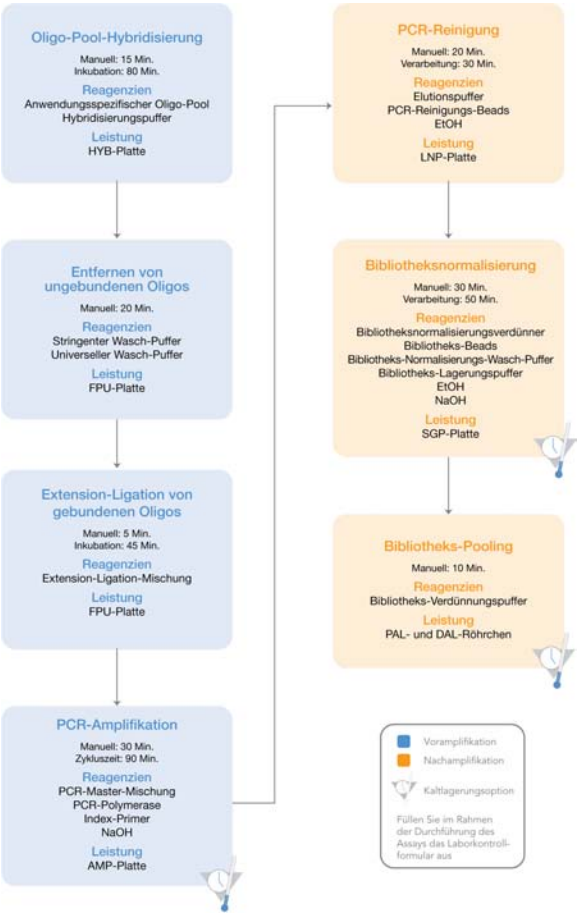
Tabelle 9 Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 Akronyme

Akronym	Definition
AMP	Amplification Plate (Amplifikationsplatte)
CLP	CLean-up Plate (Reinigungsplatte)
COP	Anwendungsspezifischer Oligo-Pool
DAL	Diluted Amplicon Library (Verdünnte Amplikon-Bibliothek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplatteneinheit)
HYB	HYBridization Plate (Hybridisierungplatte)
LNP	Library Normalization Plate (Bibliotheksnormalisierungsplatte)
NTC	Negative Template Control (Negative Matrizenkontrolle)
PAL	Pooled Amplicon Library (Gepoolte Amplikon-Bibliothek)
POS	Positive Kontrollprobe
SGP	StoraGe Plate (Lagerungsplatte)

Protokoll-Workflow

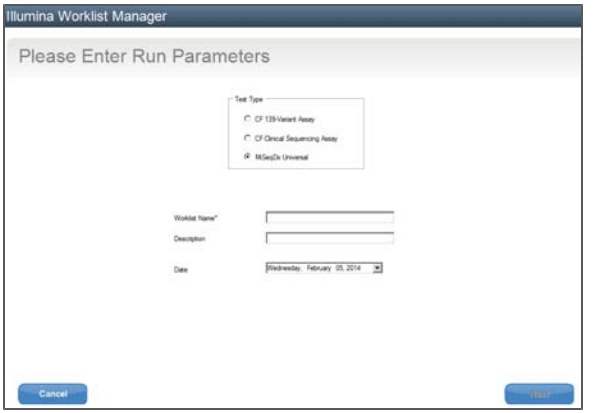
Das folgende Schaubild verdeutlicht den Workflow des Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Abbildung 1 Workflow des Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0



1 Wählen Sie im Illumina Worklist Manager-Begrüßungsbildschirm die Option **Create Worklist** (Arbeitsliste erstellen). Der Bildschirm „Enter Run Parameters“ (Laufparameter eingeben) wird geöffnet.

Abbildung 2 Illumina Worklist Manager, Bildschirm „Enter Run Parameters“ (Laufparameter eingeben)



2 Wählen Sie im Feld „Test Type“ (Testtyp) die Option **MiSeqDx Universal** aus.

3 Geben Sie im Feld „Worklist Name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für das Probenblatt ein. Dies ist ein erforderliches Feld.

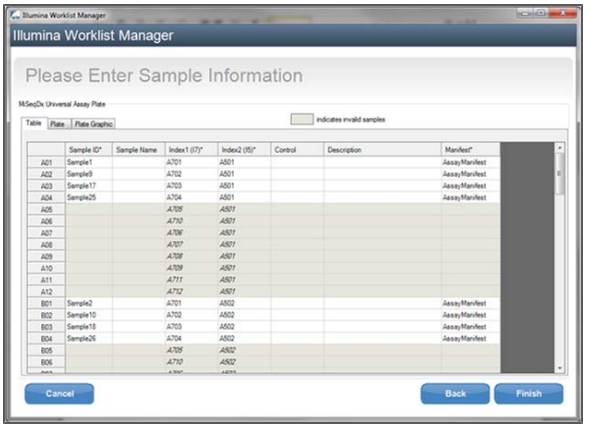
- Wenn für den Namen des Probenblatts die alphanumerische Barcode-ID der Reagenzienkartusche verwendet wird, findet die MiSeq Operating Software (MOS) das Probenblatt automatisch. (Die Barcode-ID befindet sich auf dem Etikett der Reagenzienkartusche direkt unterhalb des Barcodes.)
- Wenn ein anderer Name für das Probenblatt verwendet wird, kann die Schaltfläche **Browse** (Durchsuchen) in der MiSeq Operating Software (MOS) verwendet werden, um das entsprechende Probenblatt zu finden.

4 [Optional] Geben Sie eine Beschreibung für den Lauf ein.

5 Stellen Sie sicher, dass das Datum mit dem Startdatum des Laufs übereinstimmt. Standardmäßig wird das aktuelle Datum angezeigt.

6 Wählen Sie **Next** (Weiter). Der Bildschirm „Enter Sample Information“ (Probeninformationen eingeben) wird geöffnet.

Abbildung 3 Illumina Worklist Manager, Bildschirm „Enter Sample Information“ (Probeninformationen eingeben)



Eingeben von Probeninformationen

1 Geben Sie auf der Registerkarte „Table“ (Tabelle) oder „Plate“ (Platte) für jede enthaltene Probe die folgenden Informationen ein:

a **Sample ID** (Proben-ID) – Geben Sie eine eindeutige Proben-ID ein. Die Proben-ID dient zum Nachverfolgen der Probe von der Vorbereitung über die Sequenzierung bis hin zur Analyse. Die ID ist in der Regel ein Barcode. Jedoch wird jeder beliebige Wert akzeptiert.

b **Index 1 and Index 2** (Index 1 und Index 2) – Geben Sie den Indexadapter an, der für jedes Index-Read verwendet werden soll. Illumina empfiehlt die Verwendung von Kombinationen, die in jedem Zyklus mindestens zu einer A- bzw. C-Basis (rot) und mindestens zu einer G- bzw. T-Basis (grün) führen.

HINWEIS
Informationen zur Auswahl der entsprechenden Indizes finden sie unter *Probendurchsatz und Indexdarstellung* auf Seite 22.

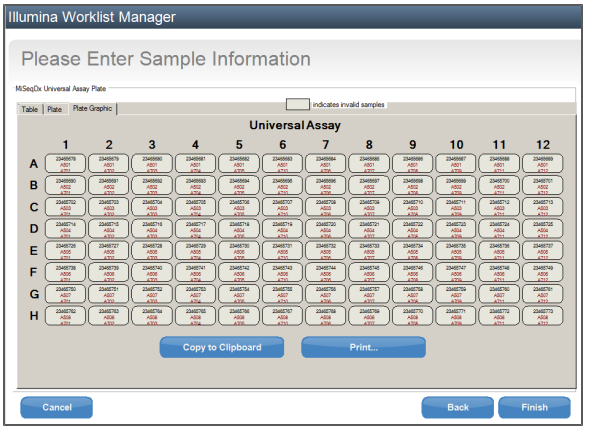
c **Manifest** – Geben Sie den Namen der Manifestdatei an, die Informationen zu den Proben in diesem speziellen Well enthält. Geben Sie die Dateierweiterung nicht als Teil des Namens an.

2 [Optional] Um detailliertere Informationen zu den Proben aufzuzeichnen, geben Sie einen Probennamen und eine Beschreibung ein.

3 [Optional] Wählen Sie zum Angeben von Kontrollen auf der Platte im Dropdown-Menü **Control** (Kontrolle) „Negative“ (Negativ) bzw. „Positive“ (Positiv) aus.

4 Wechseln Sie zur Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik) und verwenden Sie die Option **Copy to Clipboard** (In Zwischenablage kopieren) oder **Print** (Drucken), um ein Bild der Probenplatte zu erfassen.

Abbildung 4 Illumina Worklist Manager, Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik)



5 Wählen Sie **Finish** (Fertig stellen).

Probendurchsatz und Indexdarstellung

Beim Illumina MiSeqDx Universal Kit 1.0 beträgt der Probendurchsatz pro MiSeqDx-Lauf zwischen 8 und 48 Proben. Die während der PCR-Amplifikation verwendeten Index-Primer müssen auf Basis des gewünschten endgültigen Probendurchsatzes ausgewählt werden, damit Diversität in der Indexsequenz sichergestellt ist.

ANMERKUNG
Um eine maximale Effizienz beim Durchsatz zu erzielen, führen Sie die Bibliotheksvorbereitung für bis zu 96 Proben durch und teilen Sie die Proben dann in zwei Sequenzierungsläufe mit maximal 48 Proben pro Lauf auf.

MiSeqDx verwendet eine grüne LED zum Sequenzieren von G/T-Basen und eine rote LED zum Sequenzieren von A/C-Basen. Um eine ordnungsgemäße Registrierung sicherzustellen, muss in jedem Zyklus mindestens eines der zwei Nukleotide für jeden Farbkanal gelesen werden. Es ist wichtig, die Farbbalance für jede Base des sequenzierten Index-Reads zu halten. Anderenfalls kann bei der Sequenzierung des Index-Reads ein Registrierungsfehler auftreten.

Siehe Tabelle 10 für die Auswahl von Index-Primer-Kombinationen für 48 oder 96 Probenläufe.

Tabelle 10 Index-Primer-Kombinationen für 48-Proben- oder 96-Proben-Sequenzierungsläufe

Zeilen A–H	Spalten 1–6	Spalten 7-12
Index-Primer A (A501)	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 6 (A706)
Index-Primer B (A502)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 7 (A707)
Index-Primer C (A503)	Index-Primer 3 (A703)	Index-Primer 8 (A708)
Index-Primer D (A504)	Index-Primer 4 (A704)	Index-Primer 9 (A709)
Index-Primer E (A505)	Index-Primer 5 (A705)	Index-Primer 11 (A711)
Index-Primer F (A506)	Index-Primer 10 (A710)	Index-Primer 12 (A712)
Index-Primer G (A507)	--	--
Index-Primer H (A508)	--	--

Wenn Sie weniger als 48 Proben in einem Sequenzierungslauf sequenzieren, wählen Sie die entsprechenden Indizes anhand ihrer Sequenzen aus, damit die Farbbalance in den grünen und roten Kanälen aufrechterhalten wird. Weitere Informationen hierzu finden Sie in Tabelle 12 und Tabelle 13. Läufe mit 8 bis 48 Proben müssen mindestens die Index-Primer-Kombinationen enthalten, die in Tabelle 11 aufgeführt sind.

Um kleinere Läufe präzise zu verarbeiten, müssen mindestens acht Proben vorhanden sein. Wenn keine sechs eindeutigen Proben (ausgenommen die positiven und negativen Kontrollen) verfügbar sind, ist es akzeptabel, den Lauf mit Probenreplikaten von humangenomischen DNA-Proben aufzufüllen. Siehe Tabelle 11 für den minimalen Satz an Indizes mit Farbbalance, die für Sequenzierungsläufe mit acht Proben zu verwenden sind.

Tabelle 11 Index-Primer-Kombinationen für 8-Proben-Sequenzierungsläufe

	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 10 (A710)
Index-Primer C (A503)	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Index-Primer D (A504)	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Index-Primer E (A505)	Probe 7	Probe 8	--

Index-Primer-Sequenzen

Tabelle 12 Sequenzen für Index-Primer A (A501) - H (A508)

Index-Primer	Sequenz
Index-Primer A (A501)	TGAACCTT
Index-Primer B (A502)	TGCTAAGT
Index-Primer C (A503)	TGTTCTCT
Index-Primer D (A504)	TAAGACAC
Index-Primer E (A505)	CTAATCGA
Index-Primer F (A506)	CTAGAACA
Index-Primer G (A507)	TAAGTTCC
Index-Primer H (A508)	TAGACCTA

Tabelle 13 Sequenzen für Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)

Index-Primer	Sequenz
Index-Primer 1 (A701)	ATCACGAC
Index-Primer 2 (A702)	ACAGTGGT
Index-Primer 3 (A703)	CAGATCCA
Index-Primer 4 (A704)	ACAAACGG
Index-Primer 5 (A705)	ACCCAGCA
Index-Primer 6 (A706)	AACCCCTC
Index-Primer 7 (A707)	CCCAACCT
Index-Primer 8 (A708)	CACCACAC
Index-Primer 9 (A709)	GAAACCCA
Index-Primer 10 (A710)	TGTGACCA
Index-Primer 11 (A711)	AGGGTCAA
Index-Primer 12 (A712)	AGGAGTGG

Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools

Während dieses Schrittes wird der vom Benutzer bereitgestellte anwendungsspezifische Oligonukleotid-Pool mit den für die Region von Interesse spezifischen Upstream- und Downstream-Oligonukleotiden an genomische DNA-Proben hybridisiert.

WARNUNG

Die Reagenzien enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden.

Weitere Informationen finden Sie im MSDS für dieses Kit unter http://www.illumina.com/msds.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 1 Stunde und 35 Minuten
- Manuell: 15 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Hybridisierungspuffer	1 Röhrchen	-15 bis -25 °C	Illumina
Anwendungsspezifischer Oligo-Pool	5 µl pro Probe-Well	Vom Benutzer festgelegt	Benutzer
Genomische DNA (50 ng/µl empfohlen)	5 µl	-15 bis -25 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 bis 30 °C	Benutzer
Klebende Aluminiumfolienversiegelung	2 Versiegelungen	15 bis 30 °C	Benutzer
Sterile Bottiche	Nach Bedarf	15 bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

1 Bringen Sie den Anwendungsspezifischer Oligo-Pool, den Hybridisierungspuffer, die genomischen DNA-Proben und die positive Kontrollprobe auf Raumtemperatur.

2 Mischen Sie den Anwendungsspezifischer Oligo-Pool und den Hybridisierungspuffer kräftig, um sicherzustellen, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben. Zentrifugieren Sie dann kurz die Röhrchen, um Flüssigkeit zu sammeln.

HINWEIS
Halten Sie vor der Verwendung von Hybridisierungspuffer das Röhrchen ans Licht und stellen Sie sicher, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben.

3 Erhitzen Sie einen 96-Well-Hitzeblock auf 95 °C.

4 Erwärmen Sie einen Inkubator auf 37 °C, um den Extension-Ligation-Schritt vorzubereiten.

5 Erstellen Sie die Probenplatte entsprechend der von IEM ausgedruckten Plattengrafik. Stellen Sie sicher, dass die Positionen der positiven und negativen Kontrollen übereinstimmen. Illumina empfiehlt die Verarbeitung der Proben in Chargen von mindestens acht Proben.

HINWEIS
Die Verwendung von Kontrollen ermöglicht es dem Illumina Technischen Support, eine effektive Fehlerbehebung durchzuführen. Der technische Support von Illumina bietet nur dann Unterstützung, wenn diese Steuerungsreaktionen im Lauf enthalten waren.

Verfahren

1 Geben Sie der neuen 96-Well-PCR-Platte die Bezeichnung „**HYB_Plate_ID**“.

2 Fügen Sie 5 µl Probe oder Kontrolle bei 50 ng/µl (250 ng insgesamt) zu den entsprechenden Wells in der **HYB**-Platte hinzu. Folgen Sie dem generierten Plattenlayout, um eine korrekte Well-Auswahl vorzunehmen.

ANMERKUNG
Stellen Sie sicher, dass das DNA-Proben-Layout und die Positionen der positiven und negativen Kontrollen mit der Plattengrafik übereinstimmen.

3 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 5 µl Anwendungsspezifischer Oligo-Pool zu allen Wells hinzu, die genomische DNA enthalten. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

4 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 40 µl Hybridisierungspuffer zu jeder Probe in der **HYB**-Platte hinzu. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal leicht auf und ab, um zu mischen. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

ANMERKUNG
Stellen Sie sicher, dass sich Kristalle bzw. Ablagerungen in Hybridisierungspuffer aufgelöst haben.

ANMERKUNG
Mischen Sie den Anwendungsspezifischer Oligo-Pool und den Hybridisierungspuffer nicht zum Lagern. Wenn diese vermischt werden, wird der Anwendungsspezifischer Oligo-Pool selbst bei Gefrierlagerung instabil.

5 Verschließen Sie die **HYB**-Platte mit klebbarer Aluminiumfolie und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze oder einem Dichtkeil.

6 Zentrifugieren Sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C.

7 Legen Sie die **HYB**-Platte in dem mit 95 °C vorgeheizten Block ab und inkubieren Sie sie eine Minute lang.

8 Verringern Sie die Temperatur des Hitzeblocks auf 40 °C und fahren Sie mit der Inkubation fort, bis der Hitzeblock 40 °C erreicht. Diese Abkühlzeit beträgt etwa 80 Minuten.

ANMERKUNG
Während der Inkubation verringert sich die Temperatur des Hitzeblocks allmählich von 95 °C auf 40 °C. Dieser Vorgang dauert für gewöhnlich 80 Minuten. Diese allmähliche Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung kritisch. Deshalb werden PCR-Thermocycler mit aktiver Kühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) für diesen Vorgang nicht empfohlen.

SICHERER HALTEPUNKT

Nachdem der Hitzeblock 40 °C erreicht hat, bleibt die **HYB**-Platte zwei Stunden lang bei 40 °C stabil.

Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden

Bei diesem Verfahren werden unter Verwendung eines Filters, der in der Lage ist, eine Größenauswahl zu treffen, ungebundene Oligonukleotiden aus genomischer DNA entfernt. Zwei Waschgänge mit Stringenter Wasch-Puffer stellen sicher, dass ungebundene Oligonukleotide vollständig entfernt werden. Bei einem dritten Waschgang mit Universeller Wasch-Puffer werden Reste des Stringenter Wasch-Puffers entfernt und Proben für den Extension-Ligation-Schritt vorbereitet.

WARNUNG

Die Reagenzien enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden.

Weitere Informationen finden Sie im MSDS für dieses Kit unter http://www.illumina.com/msds.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 20 Minuten
- Manuell: 20 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Stringenter Wasch-Puffer	1 Flasche	2 °C bis 8 °C	Illumina
Universeller Wasch-Puffer	1 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Filterplatte	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Illumina

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Adapterkranz	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Illumina
MIDI-Platte	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

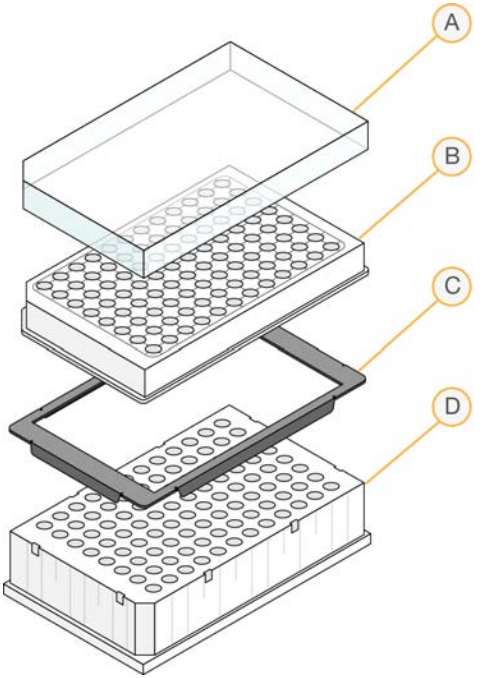
Vorbereitung

1 Nehmen Sie die Extension-Ligation-Mischung aus dem Lagerort mit einer Temperatur von -25 °C bis -15 °C heraus und tauen Sie sie bei Raumtemperatur auf.
Extension-Ligation-Mischung wird im Extension-Ligation-Schritt verwendet und benötigt etwa 20 Minuten zum Auftauen.

2 Nehmen Sie den Stringenter Wasch-Puffer und den Universeller Wasch-Puffer aus dem Kühlfach mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C heraus und stellen Sie sie bei Raumtemperatur beiseite.

3 Fügen Sie die Filterplatten-Assembly-Einheit (**FPU**) in der folgenden Reihenfolge (von oben nach unten) zusammen:

Abbildung 5 Filterplatten-Assembly-Einheit



A Deckel
B Filterplatte
C Adapterkranz
D MIDI-Platte

4 Geben Sie der Filterplatte die Bezeichnung „**FPU_Plate_ID**“. Die Platten-ID muss mit der für die **HYB**-Platte verwendeten ID übereinstimmen.

5 Waschen Sie die Filterplattenmembran vorab wie folgt:
   a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Stringenter Wasch-Puffer in jeden Well.
   b Schließen Sie die **FPU**-Platte mit dem Filterplattendeckel und halten Sie sie bei jedem Zentrifugationsschritt zugedeckt.
   c Zentrifugieren Sie **FPU** fünf Minuten lang bei 2400 × g und 20 °C.

ANMERKUNG
Illumina empfiehlt dringend, Ersatz-Filterplatten (FC-130-1006) als allgemeinen Laborbedarf bereitzuhalten.

Verfahren

1 Stellen Sie nach dem Abschluss der Hybridisierung sicher, dass der Hitzeblock auf 40 ˚C abgekühlt ist. Während sich die **HYB**-Platte noch im Hitzeblock befindet, verstärken Sie die Versiegelung mit einer Gummiwalze oder einem Dichtkeil. Wenn die Temperatur von 40 ˚C nicht innerhalb von 80 Minuten erreicht wird, fahren Sie mit der Inkubation fort, bis sich der Hitzeblock auf 40 ˚C abgekühlt hat.

2 Entfernen Sie die **HYB**-Platte aus dem Hitzeblock und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1.000 x g und 20 °C, um die Kondensation zu sammeln.

3 Übertragen Sie das gesamte Volumen jeder Probe mithilfe einer auf 60 µl eingestellten Mehrkanalpipette in die Mitte der entsprechenden, vorab gewaschenen Wells der Filterplatte. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

4 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

5 Waschen Sie die Filterplatte wie folgt:
   a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Stringenter Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
   Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

6 Wiederholen Sie den Waschvorgang wie folgt:
   a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Stringenter Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
   Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

c Wenn der Wasch-Puffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie die Filterplatte erneut fünf Minuten lang bei 2400 × g und 20 °C.

7 Entsorgen Sie den gesamten bis zu diesem Zeitpunkt angefallenen Durchfluss (der Formamid enthält) in einen entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle und setzen Sie dann die **FPU** wieder zusammen. Für den restlichen Voramplifikationsvorgang kann dieselbe MIDI-Platte verwendet werden.

8 Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Universeller Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.

Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

9 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie zehn Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

ANMERKUNG

Stellen Sie sicher, dass die gesamte Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren abgelaufen ist. Wiederholen Sie das Zentrifugieren bei Bedarf. Der Rest-Wasch-Puffer kann nachfolgende enzymatische Reaktionen verhindern.

Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden

Dieser Prozess verbindet die hybridisierten Upstream- und Downstream-Oligonukleotide. Eine DNA-Polymerase erstreckt sich vom Upstream-Oligonukleotid über die Zielregion hinaus, gefolgt von der Ligation mit dem 5'-Ende des Downstream-Oligonukleotids mittels DNA-Ligase. Das Ergebnis besteht in der Bildung von Produkten, die die gezielten Regionen von Interesse enthalten, flankiert von Sequenzen, die für die Amplifikation benötigt werden.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 50 Minuten
- Manuell: 5 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Klebende Aluminiumfolienversiegelung	1 Versiegelung	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Verfahren

1 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Extension-Ligation-Mischung zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu. Die Extension-Ligation-Reaktion findet auf der Filterplattenmembran statt.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

2 Verschließen Sie die Filterplatte mit klebbarer Aluminiumfolie und decken Sie sie dann mit dem Deckel zu, um die Folie während der Inkubation zu sichern.

3 Inkubieren Sie die gesamte **FPU**-Assemblierung im vorab erwärmten Inkubator 45 Minuten lang bei 37 °C.

4 Bereiten Sie während der Inkubation der **FPU**-Platte die AMP (Amplifikationsplatte) vor, wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

PCR-Amplifikation

In diesem Schritt werden die Extension-Ligation-Produkte unter Verwendung von Primern, die Indexsequenzen für die Proben-Multiplexierung hinzufügen, sowie von gängigen Adaptern, die für die Clusterbildung erforderlich sind, amplifiziert.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: ca. 90 Minuten
- Manuell: 30 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
PCR-Master-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Index-Primer A (A501) - H (A508)	1 Röhrchen pro Primer	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)	1 Röhrchen pro Primer	-25 °C bis -15 °C	Illumina
PCR-Polymerase	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Entsprechende PCR-Plattenversiegelung	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer
0,05 N NaOH, frisch zubereitet	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,05 N NaOH vor, indem Sie 25 µl von 10 N NaOH zu 4975 µl sterilem Wasser hinzufügen.

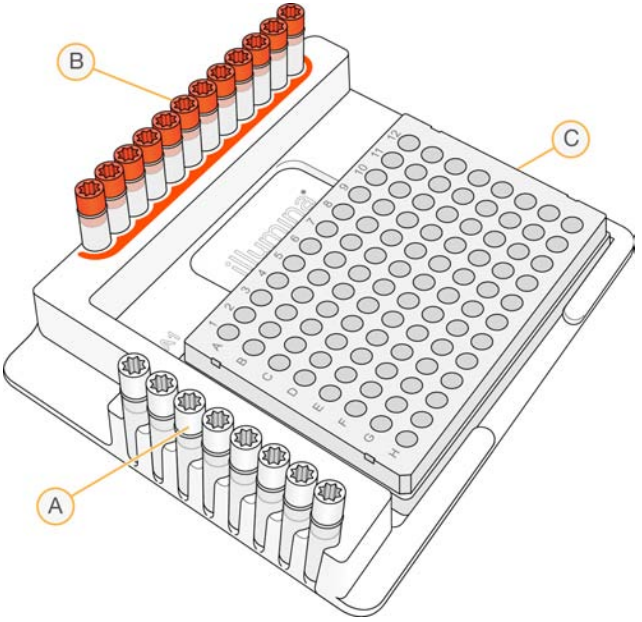
2 Ermitteln Sie anhand des Plattengrafikausdrucks von Illumina Worklist Manager die zu verwendenden Index-Primer.

3 Nehmen Sie die PCR-Master-Mischung und die entsprechenden Index-Primer aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Kühlfach und tauen Sie sie auf einem Tisch bei Raumtemperatur auf.
Tauen Sie die Reagenzien etwa 20 Minuten lang auf.

4 Sobald die Index-Primer vollständig aufgetaut sind, mischen Sie jedes Röhrchen mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz in einer Mikrozentrifuge. Verwenden Sie 1,7-ml-Eppendorf-Röhrchen als Adapter für die Mikrozentrifuge.

5 Ordnen Sie die Primer in einem Rack wie folgt an:
   a Ordnen Sie die Index-Primer A (A501) - H (A508)-Primer-Röhrchen (weiße Verschlüsse, klare Lösung) vertikal an den Reihen A bis H ausgerichtet an.
   b Ordnen Sie die Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)-Primer-Röhrchen (orangefarbene Verschlüsse, gelbe Lösung) horizontal an den Spalten 1 bis 12 ausgerichtet an.

Abbildung 6 Indexplattenvorrichtung



A Index-Primer A (A501) - H (A508) (weiße Verschlüsse)
B Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712) (orangefarbene Verschlüsse)
C **AMP**-Platte

6 Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „**AMP**“ (Amplifikationsplatte).

7 Fügen Sie Index-Primer wie folgt zur AMP-Platte hinzu:
   a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 4 µl der ausgewählten Index-Primer [A (A501) – H (A508)] zum entsprechenden Well in einer Spalte der **AMP**-Platte hinzu. Das Auswechseln der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich.
   b Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, entsorgen Sie die ursprünglichen *weißen* Verschlüsse und bringen Sie neue *weiße* Verschlüsse an.
   c Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 4 µl der ausgewählten Index-Primer [1 (A701) – 12 (A712)] (gelbe Lösung) zur entsprechenden Reihe der **AMP**-Platte hinzu. ***Die Spitzen müssen nach jeder Reihe ausgetauscht werden, um eine Index-Kreuzkontamination zu vermeiden.***

d Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, entsorgen Sie die ursprünglichen *orangefarbenen* Verschlüsse und bringen Sie neue *orangefarbene* Verschlüsse an. Entfernen Sie alle Index-Primer-Röhrchen aus dem Arbeitsbereich.

8 Bereiten Sie die PCR-Gebrauchslösung aus PCR-Master-Mischung/PCR-Polymerase wie folgt vor:

a Fügen Sie für 96 Proben 56 µl PCR-Polymerase zu 2,8 ml PCR-Master-Mischung hinzu.

b Invertieren Sie die vorbereitete PCR-Gebrauchslösung zum Mischen 20-mal.

Diese Gebrauchslösung wird im nächsten Abschnitt zur **AMP**-Platte hinzugefügt. Die PCR-Gebrauchslösung ist bei Raumtemperatur 10 Minuten lang stabil.

ANMERKUNG
Fügen Sie PCR-Polymerasezu PCR-Master-Mischung kurz vor dem Gebrauch hinzu. Bewahren Sie die PCR-Gebrauchslösung niemals auf.

Verfahren

1 Entnehmen Sie nach dem Beenden der 45-minütigen Extension-Ligation-Reaktion die **FPU** aus dem Inkubator. Entfernen Sie die Aluminiumfolienversiegelung und ersetzen sie sie durch den Deckel der Filterplatte.
Es wird empfohlen, vor dem Zentrifugieren die Aluminiumfolienversiegelung zu entfernen, um sicherzugehen, dass der Reaktionsüberstand wirksam in die Abfallplatte abläuft.

2 Zentrifugieren Sie **FPU** zwei Minuten lang bei 2400 × g und 20 °C.

3 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 25 µl 0,05 N NaOH zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu. Pipettieren Sie das NaOH fünf- bis sechsmal auf und ab und achten Sie dabei darauf, dass die Pipettenspitzen die Membran berühren. Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden.

4 Decken Sie die Filterplatte ab und inkubieren Sie sie fünf Minuten lang bei Raumtemperatur.

5 Verwenden Sie während der Inkubation der Filterplatte eine Mehrkanalpipette, um 22 µl der PCR-Gebrauchslösung in jeden Well der AMP-Platte mit Index-Primern zu übertragen. Tauschen Sie zwischen den Proben die Spitzen aus.

6 Übertragen Sie die vom Filter eluierten Proben wie folgt zur AMP-Platte:

a Stellen Sie eine P20-Mehrkanal-Pipette auf 20 µl ein.
b Pipettieren Sie die Proben in der ersten Spalte der Filterplatte fünf- bis sechsmal auf und ab.
c Übertragen Sie 20 µl von der Filterplatte zur entsprechenden Spalte der **AMP**-Platte.
d Pipettieren Sie leicht fünf- bis sechsmal auf und ab, um die DNA mit der PCR-Gebrauchslösung gründlich zu mischen.

ANMERKUNG
Neigen Sie die **FPU**-Platte leicht, um die vollständige Aspiration sicherzustellen und um Luftblasen zu verhindern.

e Übertragen Sie in ähnlicher Weise die verbleibenden Spalten von der Filterplatte zur AMP-Platte. ***Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden, um Index- und Probenkreuzkontaminierungen zu vermeiden.***
f Nach der Übertragung aller Proben kann die MIDI-Abfallsammelplatte der **FPU** entsorgt werden. Reinigen Sie den metallischen Adapterkranz und bewahren Sie ihn für die künftige Verwendung auf.

7 Versiegeln Sie die **AMP**-Platte mit der entsprechenden Plattenversiegelung und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze.

8 Zentrifugieren Sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C.

9 Übertragen Sie die AMP-Platte in den Nachamplifikationsbereich.

10 Führen Sie mithilfe des folgenden Programms auf einem Thermocycler eine PCR durch:
- 95 °C für 3 Minuten
- 25 Zyklen von:
  - 95 °C für 30 Sekunden
  - 62 °C für 30 Sekunden
  - 72 °C für 60 Sekunden
- 72 °C für 5 Minuten
- Halten Sie die Temperatur konstant bei 10 °C

SICHERER HALTEPUNKT
Falls Sie nicht gleich mit der PCR-Reinigung fortfahren, kann die **AMP**-Platte über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder sie kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden.

PCR-Reinigung

In diesem Verfahren werden PCR-Reinigungs-Beads verwendet, um die PCR-Produkte von den anderen Reaktionskomponenten zu reinigen.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 50 Minuten
- Manuell: 20 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Elutionspuffer	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Illumina
PCR-Reinigungs-Beads	400 µl pro 8 Proben	2 °C bis 8 °C	Illumina
80 % Ethanol, frisch zubereitet	5 ml pro 8 Proben	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-MIDI-Platten	2	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Klebende Plattenversiegelung	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

ANMERKUNG
Bitte lesen Sie im Abschnitt **Vorsichtsmaßnahmen** am Anfang dieses Protokolls die wichtigen Hinweise zur Handhabung der magnetischen Beads und zum Waschen mit 80%igem Ethanol während der PCR-Reinigung.

1 Bringen Sie die PCR-Reinigungs-Beads auf Raumtemperatur.

2 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol aus reinem Ethanol zu.

ANMERKUNG
Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol für die Schritte des Waschlaufs zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälscht.

Verfahren

1 Zentrifugieren Sie die AMP-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C, um die Kondensation zu sammeln.

2 Beschriften Sie eine neue MIDI-Platte mit „**CLP_Plate_ID**“ (CLean-up Plate, Reinigungsplatte).

3 Invertieren Sie die PCR-Reinigungs-Beads zehnmal. Mischen Sie kräftig mit dem Vortexer und invertieren Sie erneut zehnmal.

4 Inspizieren Sie die Lösung visuell, um sicherzugehen, dass die Beads gut resuspendiert sind.

5 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl PCR-Reinigungs-Beads zu jedem Well der **CLP**-Platte hinzu.

6 Übertragen Sie mithilfe einer auf 60 µl eingestellten Mehrkanalpipette das vollständige PCR-Produkt von der AMP- zur **CLP**-Platte. Tauschen Sie zwischen den Proben die Spitzen aus.

7 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

8 Schütteln Sie die **CLP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm.

9 Inkubieren Sie 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C), ohne zu schütteln.

10 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

11 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und entfernen und entsorgen Sie mithilfe einer auf 100 µl eingestellten Mehrkanalpipette vorsichtig den Überstand. Tauschen Sie zwischen den Proben die Spitzen aus.

ANMERKUNG
Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte zwei Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

12 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit frisch zubereitetem 80%igem Ethanol wie folgt:
   a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol zu jedem Probe-Well hinzu. Das Austauschen der Spitzen ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt brauchen Sie die Beads nicht zu resuspendieren.
   b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
   c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.

13 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und führen Sie einen zweiten Ethanol-Waschlauf wie folgt durch:
   a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol zu jedem Probe-Well hinzu.
   b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
   c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.

14 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssiges Ethanol zu entfernen.

15 Entfernen Sie die **CLP**-Platte vom Magnetstativ und lassen Sie die Beads 10 Minuten lang an der Luft trocknen.

16 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 30 µl Elutionspuffer zu jeder Probe hinzu und mischen Sie dies dann kurz mit dem Vortexer.
   Das Austauschen der Spitzen ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

17 Versiegeln Sie die Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

18 Schütteln Sie die **CLP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm.

ANMERKUNG
Stellen Sie sicher, dass alle Proben vollständig resuspendiert sind. Wenn es Proben gibt, in denen die Beads nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese vorsichtig auf und ab, um die Beads zu resuspendieren, und wiederholen Sie die beiden vorhergehenden Schritte.

19 Inkubieren Sie zwei Minuten lang bei Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C).

20 Platzieren Sie die **CLP**-Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

21 Beschriften Sie eine neue MIDI-Platte mit „**LNP_Plate_ID**“ (Library Normalization Plate, Bibliotheksnormalisierungsplatte).

22 Übertragen Sie mithilfe einer P20-Mehrkanalpipette und feinen Spitzen vorsichtig 20 µl des Überstands von der **CLP**-Platte auf die **LNP**-Platte. Tauschen Sie nach jeder Probe die Spitzen aus, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

ANMERKUNG

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte zwei Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

23 [Optional] Übertragen Sie die verbleibenden 10 µl Überstand von der **CLP**-Platte auf eine neue Platte und beschriften Sie diese Platte mit einem Laufnamen und Datum. Lagern Sie diese Platte bis zum Ende des Sequenzierungslaufs und der Datenanalyse bei -25 °C bis -15 °C. Die gereinigten PCR-Produkte können im Falle von Probenfehlern zur Fehlerbehebung verwendet werden.

24 Wenn Sie den Vorgang an diesem Punkt beenden, versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C, um sicherzustellen, dass sich der gesamte Überstand am Boden des Wells befindet.

SICHERER HALTEPUNKT

Nach der PCR-Reinigung ist die Platte drei Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C stabil.

Bibliotheksnormalisierung

Dieses Verfahren normalisiert die Menge jeder Bibliothek, um eine ausgewogene Bibliotheksrepräsentation in der gepoolten Probe zu gewährleisten.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 1 Stunde und 20 Minuten
- Manuell: 30 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Bibliotheksnormali-sierungsverdünner	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Bibliothek-Beads	1 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer	2 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Bibliothek-Lagerungspuffer	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Illumina
0,1 N NaOH, frisch zubereitet	2 ml pro 48 Proben	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
15 ml konisches Röhrchen	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Klebende Plattenversiegelung	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

WARNUNG

Die Reagenzien enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden.

Weitere Informationen finden Sie im MSDS für dieses Kit unter http://www.illumina.com/msds.

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,1N NaOH vor, indem Sie 30 µl von 10 N NaOH zu 2970 µl sterilem Wasser hinzufügen.

2 Nehmen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner aus dem Lagerort mit einer Temperatur von -25 bis -15 °C heraus und bringen Sie ihn auf Raumtemperatur. Verwenden Sie bei Bedarf ein Wasserbad mit einer Temperatur von 20 °C bis 25 °C.

ANMERKUNG

Bibliotheksnormalisierungsverdünner könnte sichtbare Ausfällungen oder Kristalle bilden. Mischen Sie die Lösung vor dem Gebrauch kräftig mit dem Vortexer. Halten Sie dann das Röhrchen vor eine Lichtquelle und prüfen Sie die Lösung visuell, um sicherzustellen, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.

3 Nehmen Sie die Bibliothek-Beads und den Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C heraus und bringen Sie sie auf Raumtemperatur.
Verwenden Sie bei Bedarf ein Wasserbad mit einer Temperatur von 20 °C bis 25 °C.

4 Mischen Sie die Bibliothek-Beads kräftig eine Minute lang mit dem Vortexer (zeitweilig mit Inversion), bis die Beads resuspendiert sind und sich kein Pellet im unteren Bereich des Röhrchens befindet, wenn das Röhrchen invertiert wird.

Verfahren

1 Geben Sie für 96 Proben 4,4 ml Bibliotheksnormalisierungsverdünner in ein frisches konisches 15-ml-Röhrchen. Wenn Sie weniger als 24 Proben verarbeiten,

verwenden Sie ein frisches 1,5-ml-Röhrchen.

2 Verwenden Sie eine auf 1.000 µl eingestellte P1000-Pipette, um die Bibliothek-Beads gründlich zu resuspendieren, indem Sie zehnmal auf- und abpipettieren.

ANMERKUNG
Es ist äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet im unteren Bereich des Röhrchens vollständig zu resuspendieren. Durch die Verwendung einer P1000 wird sichergestellt, dass die Beads homogen resuspendiert werden und sich keine Bead-Masse im unteren Bereich des Röhrchens befindet. Dies ist unerlässlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der Fließzelle zu erzielen.

3 Geben Sie für 96 Proben mit einer Pipette 800 µl Bibliothek-Beads in das Röhrchen mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner. Mischen Sie die Lösung gründlich, indem Sie das Röhrchen 15- bis 20-mal invertieren.

ANMERKUNG
Eine auf 1.000 µl eingestellte P1000 wird benötigt, um in Schritt 2 die Beads vollständig zu resuspendieren. Mischen Sie nur die angegebenen Mengen an Bibliotheksnormalisierungsverdünner und Bibliothek-Beads. Sie müssen die verbleibenden Mengen an Bibliotheksnormalisierungsverdünner und Bibliothek-Beads getrennt bei deren jeweils empfohlenen Temperaturen lagern. Um die Stabilität zu bewahren, dürfen Bibliothek-Beadss nie eingefroren oder mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner gemischt werden, wenn sie nicht umgehend gebraucht werden.

4 Geben Sie mithilfe einer Mehrkanalpipette 45 µl der kombinierten Bibliotheksnormalisierungsverdünner/Bibliothek-Beads-Gebrauchslösung in jeden Well der **LNP**-Platte mit den Bibliotheken. Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

5 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

6 Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 30 Minuten lang bei 1.800 rpm.

ANMERKUNG
Diese 30-minütige Inkubation ist kritisch für die ordnungsgemäße Bibliotheksnormalisierung. Eine Inkubationszeit von mehr oder weniger als 30 Minuten kann die Bibliotheksdarstellung und die Clusterdichte beeinträchtigen.

7 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

8 Lassen Sie die **LNP**-Platte auf dem Magnetstativ und verwenden Sie eine auf 80 µl eingestellte Mehrkanalpipette, um vorsichtig den Überstand zu entfernen und ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle zu entsorgen.

ANMERKUNG

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte und lassen Sie die Platte zwei Minuten oder so lange ruhen, bis der Überstand klar ist.

9 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer wie folgt:

a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.

Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

b Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

c Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1.800 rpm.

d Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

e Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle.

10 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und wiederholen Sie den Waschvorgang mit Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer wie folgt:

a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer in jeden Well.

Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

b Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

c Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1.800 rpm.

d Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten lang auf dem Magnetstativ.

e Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle.

11 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssige Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer zu entfernen.

12 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und fügen Sie 30 µl 0,1 N NaOH zu jedem Well hinzu, um die Probe zu eluieren.

13 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.

14 Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1.800 rpm.

15 Beschriften Sie während der fünfminütigen Elution eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „**SGP_Plate_ID**“ (StoraGe-Platte).

16 Fügen Sie 30 µl Bibliothek-Lagerungspuffer zu jedem Well hinzu, der in der **SGP**-Platte verwendet werden soll.

17 Stellen Sie nach Beendigung der fünfminütigen Elution sicher, dass alle Proben in der **LNP**-Platte vollständig resuspendiert sind. Falls die Proben nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese Proben behutsam auf- und ab oder klopfen Sie die Platte leicht gegen den Labortisch, um die Beads zu resuspendieren, und schütteln Sie sie für weitere fünf Minuten.

18 Platzieren Sie die **LNP**-Platte mindestens zwei Minuten lang auf dem Magnetstativ.

19 Übertragen Sie mithilfe einer auf 30 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand von der **LNP**- auf die **SGP**-Platte. Pipettieren Sie leicht fünfmal auf und ab, um zu mischen.

ANMERKUNG

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte zwei Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

20 Versiegeln Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und zentrifugieren Sie sie anschließend eine Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie nicht gleich mit dem Bibliotheks-Pooling und der anschließenden Sequenzierung auf dem MiSeqDx fortfahren, bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bis zu 3 Tage bei -25 °C bis -15 °C auf.

Bibliotheks-Pooling

Bei der Vorbereitung für die Clusterbildung und die Sequenzierung werden vor der Sequenzierung auf dem MiSeqDx-Gerät gleiche Mengen normalisierter Bibliothek kombiniert, im Hybridisierungspuffer verdünnt und hitzedenaturiert. PhiX wird als interne Kontrolle für die Sequenzierung verwendet.

Geschätzte Zeit

- Gesamtdauer: 10 Minuten
- Manuell: 10 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Bibliothek-Verdünnungspuffer	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
10 nM Interne PhiX-Kontrolle	2 µl	-25 °C bis -15 °C	Illumina
0,1 N NaOH, frisch zubereitet	1 ml	15 °C bis 30 °C	Benutzer
1X TE-Puffer	8 µl	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Eppendorf-Gefäße (Schraubverschluss empfohlen)	2 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Benutzer
PCR-8-fach-Röhrchenstreifen	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer
2,5-l-Eiskübel	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitungen für Bibliotheks-Pooling

1 Erhitzen Sie einen für 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen passenden Hitzeblock auf 96 °C.

2 Bereiten Sie in einem Eiskübel ein Eiswasserbad vor. Kühlen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer im Eiswasserbad.

3 Beginnen Sie mit dem Auftauen der MiSeqDx-Reagenzienkartusche.

Vorbereiten einer frischen Verdünnung von NaOH

ACHTUNG!
Die Verwendung von frisch verdünntem NaOH ist notwendig, um die Proben für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx vollständig zu denaturieren.

Bereiten Sie zum Denaturieren der Proben 1 ml 0,1 N NaOH vor. Durch das Vorbereiten eines Volumens von 1 ml wird verhindert, dass sich kleine Pipettierungsfehler auf die endgültige NaOH-Konzentration auswirken.

1 Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Mikrozentrifugenröhrchen:
- DNasen-, RNasenfreies Wasser (900 µl)
- Stock 1.0 N NaOH (100 µl)

2 Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen mehrmals.

Interne PhiX-Kontrolle denaturieren und verdünnen

1 Mischen Sie folgende Volumina, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek auf 2 nM zu verdünnen:
- 10 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (2 µl)
- 1X TE-Puffer (8 µl)

2 Mischen Sie die folgenden Volumina von 2 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek und 0.1 N NaOH in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um eine 1 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten:
- 2 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (10 µl)
- 0,1 N NaOH (10 µl)

3 Mischen Sie die Lösung mit 1 nM Interne PhiX-Kontrolle kurz mit dem Vortexer.

4 Zentrifugieren Sie die Matrizenlösung eine Minute lang bei 280 x g und 20 °C.

5 Inkubieren Sie die Lösung 4,5 Minuten lang bei Raumtemperatur, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek in Einzelstränge zu denaturieren.

6 Geben Sie das folgende Volumen von vorgekühltem Bibliothek-Verdünnungspuffer in das Röhrchen mit denaturierter Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek, um eine 20 pM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten.

- Denaturierte Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (20 µl)
- Vorgekühlter Bibliothek-Verdünnungspuffer (980 µl)

ANMERKUNG
Sie können die denaturierte 20 pM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek bei -25 °C bis -15 °C bis zu drei Wochen lang als Aliquote für den Einmalgebrauch aufbewahren. Nach drei Wochen verringert sich die Anzahl der Cluster.

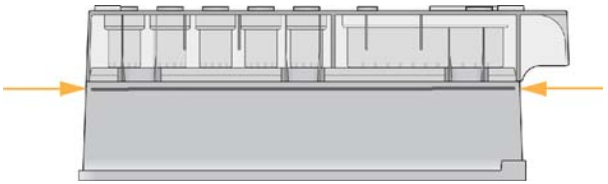
Vorbereiten der Reagenzienkartusche

In den folgenden Anweisungen wird beschrieben, wie die Reagenzienkartusche in einem Wasserbad mit Raumtemperatur aufgetaut wird. Diese Methode nimmt etwa eine Stunde in Anspruch.

1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem Lagerort mit einer Temperatur von -25 °C bis -15 °C heraus.

2 Legen Sie die Reagenzienkartusche in ein Wasserbad, das ausreichend raumtemperiertes deionisiertes Wasser enthält, um die Basis der Reagenzienkartusche bis zur auf der Reagenzienkartusche aufgedruckten Wasserlinie einzutauchen. Das Wasser darf die maximale Wasserlinie nicht übersteigen.

Abbildung 7 Maximale Wasserlinie



3 Lassen Sie die Reagenzienkartusche im raumtemperierten Wasserbad etwa eine Stunde oder so lange auftauen, bis sie vollständig aufgetaut ist.

4 Nehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und klopfen Sie sie vorsichtig auf dem Tisch ab, um das Wasser von der Basis der Kartusche zu entfernen.

Trocknen Sie die Basis der Kartusche ab. Stellen Sie sicher, dass kein Wasser auf die Oberseite der Reagenzienkartusche gespritzt ist.

Überprüfen der Reagenzienkartusche

1 Invertieren Sie die Reagenzienkartusche zehnmal, um die aufgetauten Reagenzien zu mischen, und überprüfen Sie anschließend visuell, ob alle Positionen aufgetaut sind.

HINWEIS

Es ist äußerst wichtig, dass die Reagenzien in der Kartusche vollständig aufgetaut und gemischt sind, damit eine ordnungsgemäße Sequenzierung sichergestellt werden kann.

2 Überprüfen Sie visuell das Reagenz in Position 1, um sicherzustellen, dass es vollständig gemischt ist und keine Ausfällungen enthält.

3 Klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf dem Tisch ab, um Luftblasen in den Reagenzien zu entfernen.

ANMERKUNG

Die MiSeqDx-Sipper-Röhrchen reichen bis zum Boden der einzelnen Behälter, um die Reagenzien zu aspirieren. Deshalb ist es wichtig, dass sich keine Luftblasen in den Behältern befinden.

4 Lagern Sie die Reagenzienkartusche auf Eis bzw. lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C (bis zu sechs Stunden), bis Sie den Lauf konfigurieren können. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

Vorbereiten von Proben für die Sequenzierung

1 Bringen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer auf Raumtemperatur. Mischen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.

2 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, tauen Sie die **SGP**-Platte bei Raumtemperatur auf.

3 Zentrifugieren Sie die **SGP**-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C, um die Kondensation zu sammeln.

4 Beschriften Sie das neue Eppendorf-Gefäß mit „**PAL-Platten-ID**“ (Pooled Amplicon Library).

5 Suchen Sie die Proben aus, die für die Sequenzierung zu einem Pool zusammengefasst werden sollen. Es können maximal 48 Proben für die Sequenzierung zu einem Pool zusammengefasst werden.

6 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, mischen Sie unter Verwendung einer auf 40 µl eingestellten P200-Mehrkanalpipette jede zu sequenzierende Bibliothek, indem Sie drei- bis fünfmal auf- und abpipettieren. Tauschen Sie zwischen den Proben die Spitzen aus.

7 Übertragen Sie 5 µl von jeder zu sequenzierenden Bibliothek von der **SGP**-Platte Spalte für Spalte auf einen PCR-8-fach-Röhrchenstreifen. Verschließen Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und legen Sie sie beiseite.

HINWEIS
Bewahren Sie die versiegelte **SGP** -Platte bei -25 °C bis -15 °C auf. Die versiegelte **SGP**-Platte kann maximal 3 Tage lang aufbewahrt werden.

8 Kombinieren und übertragen Sie den Inhalt des PCR-8-fach-Röhrchenstreifens in das **PAL**-Röhrchen. Schütteln Sie das **PAL**-Röhrchen gründlich.

9 Beschriften Sie das neue Eppendorf-Gefäß mit „**DAL-Platten-ID**“ (Diluted Amplicon Library).

10 Geben Sie 585 µl Bibliothek-Verdünnungspuffer in das **DAL**-Röhrchen.

11 Geben Sie 6 µl von 20 pM Interne PhiX-Kontrolle in das **DAL**-Röhrchen. Pipettieren Sie mit derselben Spitze drei- bis fünfmal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.

12 Übertragen Sie 9 µl **PAL** in das **DAL**-Röhrchen, das Bibliothek-Verdünnungspuffer enthält. Pipettieren Sie mit derselben Spitze drei- bis fünfmal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.

13 Mischen Sie das **DAL**-Röhrchen mit dem Vortexer bei höchster Geschwindigkeit.

HINWEIS

Wenn Sie die verbleibende **PAL** für eine zukünftige Verwendung aufbewahren möchten, lagern Sie das **PAL**-Röhrchen bei -25 °C bis -15 °C. **PAL** kann drei Tage lang aufbewahrt werden.

Die verdünnte **DAL** muss frisch vorbereitet sein und sofort für das Laden von MiSeqDx verwendet werden. Das Lagern der **DAL**führt zu einer signifikanten Verringerung der Clusterdichte.

14 Zentrifugieren Sie das **DAL** -Röhrchen eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C, um Inhalt zu sammeln.

15 Inkubieren Sie das **DAL**-Röhrchen bei 96 °C zwei Minuten lang unter Verwendung eines Hitzeblocks.

16 Invertieren Sie das **DAL**-Röhrchen nach der Inkubation ein- bis zweimal, um es gut zu mischen, und legen Sie es dann sofort in das Eiswasserbad.

17 Belassen Sie das **DAL**-Röhrchen fünf Minuten lang im Eiswasserbad.

ANMERKUNG

Sie müssen den Schritt der Hitzedenaturierung direkt vor dem Laden der **DAL** in die MiSeqDx-Reagenzienkartusche durchführen, um zu gewährleisten, dass die Matrize effizient in die MiSeqDx-Fließzelle geladen wird.

Weitere Schritte

Sobald die Amplikonbibliothek mit dem verdünnten und denaturierten PhiX gepoolt wurde, können die Bibliotheken auf MiSeqDx-Reagenzienkartusche im angegebenen Behälter mit der Bezeichnung **Load Samples** (Proben laden) geladen werden. Der Sequenzierungslauf wird dann mithilfe der MiSeq Operating Software (MOS)-Schnittstelle eingerichtet. Weitere Anweisungen hierzu finden Sie im *MiSeqDx-Gerät – Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15038353_DEU).*

Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich an den IlluminaTechnischen Support.

Tabelle 14 IlluminaAllgemeine Kontaktinformationen

Illumina-Website	www.illumina.com
E-Mail	techsupport@illumina.com

Tabelle 15 Telefonnummern des Illumina-Kundendiensts

Region	Telefonnummer	Region	Telefonnummer
Nordamerika	1.800.809.4566	Italien	800.874909
Belgien	0800.81102	Niederlande	0800.0223859
Dänemark	80882346	Norwegen	800.16836
Deutschland	0800.180.8994	Österreich	0800.296575
Finnland	0800.918363	Schweden	020790181
Frankreich	0800.911850	Schweiz	0800.563118
Großbritannien	0800.917.0041	Spanien	900.812168
Irland	1.800.812949	Andere Länder	+44.1799.534000

Materialsicherheitsdatenblätter

Wenden Sie sich bezüglich der Sicherheitsdatenblätter (SDSs) an den technischen Support von Illumina.

Produktdokumentation

Die Produktdokumentation steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu www.illumina.com/support, wählen Sie ein Produkt aus und klicken Sie anschließend auf **Documentation & Literature**.

Illumina
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP
Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH Den Haag
Niederlande